

Non-fibrogenic high mannuronate alginate coated transplants, processes for their manufacture, and methods for their use

Publication number: JP7507550 (T)

Publication date: 1995-08-24

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: A01N1/02; A61K9/16; A61K9/50; A61L27/20; A61L27/34; A61L27/36; A61L27/38; B01J2/00; C12N11/04; C12N5/00; C12N5/071; A61K35/12; (IPC1-7): A01N1/02

- European: A01N1/02; A01N1/02C; A01N1/02C4; A61K9/16H6F; A61K9/50H6D; A61K9/50K; A61K9/50P; A61L27/36; A61L27/38; B01J2/00B; C12N11/04; C12N5/00C; C12N5/06B22A; A61L27/20; A61L27/34

Application number: JP19930500889T 19930601

Priority number(s): WO1993US05461 19930601; US19920891564 19920529

Also published as:

 US5693514 (A)
 US5429821 (A)
 US5578314 (A)
 WO9324077 (A1)
 EP0642326 (A1)

more >>

Abstract not available for JP 7507550 (T)

Abstract of corresponding document: **US 5693514 (A)**

A transplant with a core of a viable, physiologically active, cell(s) and a non-fibrogenic coating of alkaline earth metal alginate having a high mannuronate to guluronate molar ratio and free from fibrogenic amounts of fucose, sulfate, phloroglucinol and protein moieties. The coating has a permeability sufficiently low and a thickness sufficiently large to protect the tissue cells from host immunological agents after transplantation, the coating also being sufficiently permeable and thin to permit the diffusion of cell sufficient nutrients and cell products through the coating required for cell viability. The alginate coating can be reacted with polylysine to form a polylysine-alginate complex on the outer surface thereof. The complex can then be reacted with polyaspartic acid to provide a physiologically acceptable negative surface charge.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-507550

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)8月24日

(51) Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

F I

A 0 1 N 1/02

9155-4H

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平6-500889	(71) 出願人	ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)6月1日		アメリカ合衆国 94612-3550 カリフォ ルニア州 オークランド トウェンティー
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)11月29日		セカンド フロア レイクサイド ドライ ブ 300
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 3 / 0 5 4 6 1	(72) 発明者	ドリアン、ランデル イー、
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 2 4 0 7 7		アメリカ合衆国 94563 カリフォルニア
(87) 国際公開日	平成5年(1993)12月9日		州 オリンダ オーク ロード 15
(31) 優先権主張番号	8 9 1, 5 6 4	(74) 代理人	弁理士 中島 淳 (外5名)
(32) 優先日	1992年5月29日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非繊維形成誘導性アルギン酸被覆移植体、その製造方法およびその使用方法

(57) 【要約】

組織移植体は、生きた生理的に活性な組織細胞を含み、二価金属アルギン酸の非繊維形成誘導性の被覆体を有する。被覆体は、移植の後に宿主の免疫学的構成員から組織細胞を保護するのに十分に低い透過性および十分に大きい厚さを有し、細胞の生存に必要な被覆体を介する十分な細胞栄養物および細胞産物の拡散を可能とするように十分に透過性で薄い。組織細胞、脾臓島体細胞、神経細胞、腎臓皮質細胞、管内皮細胞、甲状腺細胞、副腎細胞、胸腺細胞、卵巣細胞、肝臓細胞等とすることができる。

請求の範囲

1. 非繊維形成誘導性のアルギン酸組成物であって、
 - (a) アルギン酸と二価金属イオンキレート剤を含むアルギン酸水溶液を調製し、
 - (b) 前記アルギン酸溶液と漂白した活性炭素とを、前記アルギン酸中に存在する全ゆるフカンおよび他の汚染物質を吸着するのに十分な量および時間で接触させて非繊維形成誘導性のアルギン酸を製造し、その後に前記活性炭素を前記アルギン酸溶液から除去し、
 - (c) 前記アルギン酸溶液から前記アルギン酸を沈殿させるのに有効な量で前記アルギン酸溶液にエタノールを添加し、かつ
 - (d) 前記沈殿したアルギン酸を単離することを、含む方法により調製される非繊維形成誘導性のアルギン酸組成物。
2. 方法が、
 - (e) 前記沈殿したアルギン酸を用いて生きた生理的に活性な組織または細胞を被覆し、これに二価金属イオンを添加することにより前記被覆したアルギン酸をゲル化させることを更に含む請求項1記載の組成物。
3. フカンがフコース、ポリフェノールおよび蛋白質を含み、組成物中に残留するフコースの量が約0.02重量%未満であり、かつポリフェノールの量がタンニン酸に関して約0.2重量%未満である請求項1記載の組成物。
4. 組成物中に残留するフコースの量が約0.01重量%未満である請求項3記載の組成物。
5. 組成物中に残留するフコースの量が約0.005重量%未満である請求項3記載の組成物。
6. 組成物中に残留するポリフェノールの量が、タンニン酸に関して約0.1重量%未満である請求項3記載の組成物。
7. 組成物中に残留するポリフェノールの量が、タンニン酸に関して約0.0

量を含むアルギン酸ゲルカプセル。

21. 生理的に活性な組織が生きた生理的に活性なイヌまたはラットのランゲルハンス島を含み、有効な量の前記カプセルを糖尿病状態のマウスに移植した場合に、これにより前記マウスが、移植後に少なくとも60日の間、正常血糖を維持することが可能である請求項20記載のカプセル。
22. 前記糖尿病状態のマウスが、移植後に少なくとも6か月の間、正常血糖を維持することが可能である請求項21記載のカプセル。
23. 前記糖尿病状態のマウスが、移植後に少なくとも12か月の間、正常血糖を維持することが可能である請求項21記載のカプセル。
24. 前記糖尿病状態のマウスが、移植後に少なくとも18か月の間、正常血糖を維持することが可能である請求項21記載のカプセル。
25. 被覆体が、移植後に組織を宿主の免疫学的構成員から保護するのに十分に低い透過性と十分に大きい厚さを有し、かつ被覆体を介して細胞の生存に必要な十分な細胞栄養物および細胞産物の拡散を可能とするような十分な透過性と十分な小さい厚さを有する請求項20記載のカプセル。
26. 被覆体が、少なくとも約10 μ mかつ約200 μ m未満の厚さを有する請求項20記載のカプセル。
27. 組織が、脾臓島細胞、神経細胞、腎臓皮質細胞、腎内皮細胞、甲状腺細胞、副腎細胞、胸腺細胞、卵巣細胞および肝臓細胞よりなる群から選択される少なくとも1以上の細胞形態を含む請求項20記載のカプセル。
28. 組織細胞が脾臓島細胞である請求項27記載のカプセル。
29. 二価金属イオンがカルシウムイオンを含む請求項20記載のカプセル。
30. 請求項20記載のカプセルと実質的に許容し得るキャリアーを含む複合物的組成物。
31. 組織細胞が脾臓島細胞である請求項30記載の複合物的組成物。
32. 組織を被覆する方法であって、
 - (a) アルギン酸と二価金属イオンキレート剤を含むアルギン酸水溶液を調

75重量%未満である請求項3記載の組成物。

8. 前記アルギン酸中のマテノレート/（マテノレート+グルコネート）の重量比率が約0.1~0.95である請求項1記載の組成物。
9. 前記比率が約0.15~0.85である請求項8記載の組成物。
10. 前記比率が約0.25~0.75である請求項8記載の組成物。
11. 前記アルギン酸の分子量が約2~350キロダルトンである請求項1記載の組成物。
12. 前記アルギン酸の分子量が約4~250キロダルトンである請求項11記載の組成物。
13. 前記アルギン酸の分子量が約6~120キロダルトンである請求項11記載の組成物。
14. 二価金属イオンと約2~350kDの分子量および約0.1~0.95のマテノレート/（マテノレート+グルコネート）の重量比率を有するアルギン酸を含む非繊維形成誘導性の二価金属イオン-アルギン酸ゲルであって、フコースの量が0.02重量%未満であり、ポリフェノールの量がタンニン酸に関して0.2重量%未満であり、かつ前記アルギン酸ゲルで被覆した細胞をBALB/Cマウスに移植した場合に、これが移植後に少なくとも60日の間繊維形成を實質的に誘導しない非繊維形成誘導性の二価金属イオン-アルギン酸ゲル。
15. 前記ゲルが、移植後に少なくとも6か月の間繊維形成を實質的に生じない請求項14記載のアルギン酸ゲル。
16. 前記ゲルが、移植後に少なくとも12か月の間繊維形成を實質的に生じない請求項14記載のアルギン酸ゲル。
17. 前記ゲルが、移植後に少なくとも18か月の間繊維形成を實質的に生じない請求項14記載のアルギン酸ゲル。
18. 請求項1記載の組成物で被覆した、生きた生理的に活性な組織を含むアルギン酸ゲルカプセル。
19. 請求項2記載の組成物で被覆した、生きた生理的に活性な組織を含むアルギン酸ゲルカプセル。
20. 請求項14記載のアルギン酸ゲルで被覆した、生きた生理的に活性な組

製し、

- (b) 前記アルギン酸溶液と漂白した活性炭素とを、前記アルギン酸中に存在するフカンを含着するのに十分な量および時間で接触させて非繊維形成誘導性のアルギン酸を製造し、その後に前記漂白した活性炭素を前記アルギン酸溶液から除去し、
 - (c) 前記アルギン酸溶液から前記アルギン酸を沈殿させるのに有効な量で前記アルギン酸溶液にエタノールを添加し、
 - (d) 前記沈殿したアルギン酸を単離し、かつ
 - (e) 前記沈殿したアルギン酸を用いて生きた生理的に活性な組織を被覆することを含む組織を被覆する方法。
33. 非繊維形成誘導性のアルギン酸ゲルを製造する方法であって、アルギン酸と二価金属イオンキレート剤を取得し、請求項32記載の方法の工程(a)~(e)を実施し、かつ前記被覆したアルギン酸をこれに二価金属イオンを添加することによりゲル化させることを含む非繊維形成誘導性のアルギン酸ゲルを製造する方法。
 34. 約100メッシュまたはそれより微細な粒度を有する活性炭素と約0.005~0.50Mの次亜塩素酸ナトリウム溶液とを約5~30分間接触させることにより、前記漂白した活性炭素を取得する請求項32記載の方法。
 35. 前記アルギン酸溶液中のアルギン酸に対する漂白した活性炭素の比率を約0.5:1~1:10(w:w)とする請求項34記載の方法。

明細書

非組織形成誘導性アルギン酸被覆移植体、
その製造方法およびその使用方法

発明の背景

発明の分野

この発明は、細胞および組織の医療用移植体、この種の移植体の製造およびその使用の分野に向けられたものである。特に、この発明は、移植を阻う量の不純物を含有しない新規で高度に保水性のアルギン酸（塩）（alginate）の被覆により移植体を被覆すること、この被覆方法により形成した被覆した組織、およびこのような製品を使用して作製した移植体に向けられたものである。

背景の説明

分泌その他の生物学的器官の機能欠陥のための従来の医療処置は、欠陥のある器官の同定された正常な生産物を天然または合成の薬学的組成物により取替えることに焦点を合せてきた。例えば、タイプ1または幼若性初期糖尿病としても知られているインシュリン依存性糖尿病を処置するためには、膵臓中のランゲルハンス島によるインシュリンの正常な分泌を置換しなければならない。膵臓中には機能性の島体（islet）が長年存在しないからである。この膵臓機能は、インシュリンを投与し、血液グルコースレベルの測定に反応して注人を決定調整することにより疑似される。島体のインシュリン生産および分泌は最良の場合でも不完全にしか近似されず、通常は近似は貧弱である。

器官の取替えも行われている。これは一般に、疾患に対する免疫系の完全な保護機能を患者から奪い、器官の免疫学的拒絶を防止するために、免疫抑制剤を継続的に使用することを必要とする。この手法は、限定された群の器官に対してのみ永続的な苦痛の軽減を与えるものである。免疫抑制を伴うことなく遺伝的に非類似の宿主に器官組織を移植する試みは、一般に宿主の免疫系によって失敗に終わっていた。この発明以前は、宿主の免疫系から移植体組織を隔離するための有効な保護バリアー被覆の適用は、多数の理由により医療的に実用性があるとは認め

られていなかった。被覆材料は宿主の系と不適合性であるか、さもなければ不適切であった。以前に開発された封入または被覆方法は、移植された組織が宿主中で長く有効な機能寿命を有するのに必要な所望の多孔度および厚さを有する再現可能な被覆体を生成するものではなかった。

宿主動物の免疫応答による破壊から移植体を保護するために、移植体組織または細胞と宿主の系の免疫成分との間に保護バリアーを生成する種々の試みがなされている。T.W.S. Chang (Chang, T.W.S., Science 146: 524-525 (1964)) は、半透過性ポリアミド膜中への赤血球溶血物およびウレアーゼのミクロ封入を記載している。これらのミクロカプセルは、血液流に注入した場合に長くは残存しない。Wosback らおよびChang らは、半透過性ミクロ封入微生物細胞および生きた赤血球細胞の調製を記載しており、後者の記事は、器官取替え療法のために封入した細胞を使用する可能性を記述している。(K. Wosbach et al. Acta Chem. Scand. 20: 2807-2812 (1966), Chang, T.W.S. et al. Can. J. Physiol. and Pharmacol. 41: 115-128 (1966))。

Lim らによって、生きた組織および細胞がポリリジンで被覆したアルギン酸溶液中に固定化されている。(F. Lim et al. J. Pharm. Sci., 70: 351-354 (1981))。これらの被覆した溶液を使用して、糖尿病の動物の糖尿病状態を矯正する試みがLim らによって報告されている。(Lim et al. Science 210: 908-909 (1981))。米国特許第4,251,387号、第4,324,683号、第4,352,883号、第4,407,957号、第4,663,286号および第4,803,168号はこの研究に関するものである。しかしながら、これらの生成物は動物の糖尿病状態の長期間の矯正には成功を収めておらず、ヒトの膵臓島体のような組織を移植するのに適切とは認められていない。

ポリリジンと反応させたアルギン酸カルシウム溶液中に封入した移植体を開発すべくGoosenらにより実質的な努力が更に行われたが、移植に適切な保護された移植体を提供するにはやはり不成功であった。(例えば、米国特許第4,673,566号、第4,689,293号、第4,789,550号、第4,808,355号、第4,789,550号)。

Lim らは、アルギン酸-ポリリジンカプセルを使用し、ミクロ封入したラット島体の異種移植片を用いて、NODマウスの糖尿病状態の逆行が延長されること

を報告している。(Lim et al. Diabetes 40: 1511-1516 (1991))。

米国特許第4,744,933号には、相互に反応させたアルギン酸とポリアミノ酸との外観中に生物学的に活性な材料を含有する溶液を封入することが記載されている。

米国特許第4,696,286号には、移植体の表面成分に化学的に結合する多機能性材料の表面反応性結合架橋により移植体を被覆した後に、結合架橋層に化学的に結合する重合体の半透過性で生物学的に適合性の層を施すことにより、遺伝的に非類似の個体への移植に適切な移植体を被覆する方法が記載されている。

Hackel らおよびKerstan らは、微生物細胞および酵素の固定化のためにアルギン酸カルシウムを使用することを報告している。(Hackel et al. J. Appl. Microbiol. 1: 291-296 (1975), Kerstan, W. et al. Biotech. and Bioeng., 19: 387-397 (1977))。Nigam らおよびこれに引用された刊行物には、細胞含有カルシウム溶液をアルギン酸溶液に滴下し、更にカプセルをカルシウム溶液中でインキュベートすることにより、生きた細胞をアルギン酸カルシウムの外観中に被覆する方法が記載されている。(Nigam et al. Biotech. Tech., 2: 271-276 (1988))。

Plunkett らは、アルギン酸ビーズに捕足した腫瘍細胞を使用して尿管形成のモデルを記載している。(Plunkett et al. Lab. Invest., 90: 6204-6205 (1990))。アルギン酸ナトリウム-細胞溶液液滴の噴霧体を塩化カルシウム水溶液と接触させ、アルギン酸カルシウムのビーズが形成された。ポンプ速度および空気圧力を使用し、噴霧過程における液滴の大きさが制御された。

しかしながら、アルギン酸カルシウムで被覆した移植体は、被覆した移植体が宿主の系で残存しないため、従来は組織を移植するのに使用するのに適切とは考えられていなかった。海草から得られた形態のアルギン酸は、グルコネート (glucuronate) とマヌロネート (mannuronate) との混合重合体であり、種々のレベルの他の物質を含有する。

アルギン酸カルシウムのゲル化は、主として高分子グルコネート重合体のグルコン酸部分とのカルシウムイオン結合によって生じし、これは高い多孔度を有するものであって、高度の架橋結合を与え、この結果として移植体のための強力な

保護バリアーを与えるものである。また、Skjak-Break は、既にアルギン酸重合体中に存在するD-マヌロン酸残基をL-グルコン酸に変換し得る酵素であるマヌロナーゼ-5 エピメラーゼの使用を開示している。(G. Skjak-Break, Biochem. Soc. Trans.: 20-26 (1992))。

アルギン酸は食品や薬剤製品を被覆するのに適用されているが、生きた細胞を被覆して非免疫原性の被覆体を製造するためのアルギン酸の使用は、従来は達成されていなかった。この分野のこのような研究では、細胞被覆用途のためにはアルギン酸を精製することが必要であると認識されている。例えば、蛋白質およびポリフェノールを除去する手段としてろ過が示唆されている。しかしながら、精製されたアルギン酸自体でさえ免疫原性である。Soon-Shiong らは、大型動物における移植したアルギン酸マイクロカプセルの組織性過剰生育を観察している。(Soon-Shiong et al. Trans. Proc., 23: 758-9. (1991))。この研究により、市販のアルギン酸は、しばしばポリフェノールおよび他の免疫原性物質で汚染されていることが見出された。しかしながら、精製した場合であっても、マヌロン酸含有量が高い市販のアルギン酸は免疫原性のままであり、生体内でマクロファージを活性化すると共に組織性の過剰生育を生じし得るものである。同様に、Espevik らは、全てのアルギン酸は固有に組織形成誘導性であることを示唆している。(Espevik et al. Cell Trans. 1: 165 (1992), T. Zekorn. Cell Trans. 1: 176 (1992))。他には、高マヌロネートのアルギン酸はヒト胚芽を刺激してサイトカインを生成すること (M. Otterlei et al. J. Immunother. 10: 286-291 (1991))、またはマクロファージの移動を増強すること (M. Fujihara and T. Nagumo. Carbohydrate Research 243: 211-216 (1993)) が報告されており、これらが何故生体適合性ではないかが示唆されている。よって、従来技術においては、アルギン酸、少なくともマヌロネートの有意な成分を有するアルギン酸は、サイトカイン生産、マクロファージ移動を刺激し、固有に組織形成誘導性であることが合意事項であると考えられる。精製したアルギン酸は細胞を被覆するのに使用し得る可能性があるというこの分野における認識があるにも拘らず、今回に至るまで良い非免疫原性の被覆体は達成されていない。

アルギン酸の組成およびアルギン酸の精製および分析方法は一般的に記載され

ている (Haug, A. 「アルギン酸の組成と性質」 (Composition and Properties of Alginates) : 報告番号30, Horsk Institutt for Tang-og Tareforskning (Norwegian Institute of Seaweed Research) (1964); Haug, A. Acta Chem. Scand. 13: 601-603 (1959); Haug et al. Acta Chem. Scand. 19: 1221-1226 (1965); Haug et al. Acta Chem. Scand. 21: 691-704 (1967); Smidrod et al. Acta Chem. Scand. 22: 1989-1997 (1968); および Skjåk-Bræk et al. Biotech. and Bioeng. 33: 90-94 (1989))。アルギン酸ゲルビーズの化学的性質と物理的性質との間の相関関係も報告されている (Martinsen et al. Biotech. and Eng. 33: 70-89 (1989))。

200 μm より大きい厚さを有するアルギン酸被覆体は、宿主の系に移植した場合に、栄養物および細胞産物が被覆した移植体の長期間の生存性のために十分な量で被覆体を介して流れるのを可能とするのに必要な透過性を欠如することが報告されている。(Chicheportiche et al. Horm. Met. Res. Suppl. 26: 209-213 (1990))。

したがって、宿主の免疫系によって実質的に拒絶されない新規な被覆移植体に対する必要性が依然として存在している。

発明の要旨

この発明は、移植のための被覆した生きた生理的に活性な組織または細胞に関するものであり、これは宿主に対して生理的に許容し得るものであって、移植した組織細胞の、宿主の免疫系による破壊からの長期間に渡る保護を効果的に提供するためのものである。

またこの発明は、移植の後の健康、長い寿命および有効な機能に必要な量の栄養物および他の物質の移植した細胞または組織への拡散を可能とする厚さ、および移植した組織または細胞の産物の宿主の系への有効な拡散および放出を可能とする透過性を有する被覆カプセルに封入した組織細胞に関する。

更にこの発明は、有効な移植組織被覆材料に関するものであり、これは生理的に許容し得て非組織形成誘導性であると共に宿主に対して非毒性であって、前記した特性を有する被覆体を提供するのに使用し得るものである。

体の大量生産のための効率的な手順を開発してここに提供するものであり、これらは、移植に際して、例えば膵臓島体の機能を無期限に回復させるのに使用できることを突き止めた。

この発明以前は、アルギン酸被覆体の外側表面をポリリジンと反応させることが、アルギン酸被覆移植体には必要であると報告されていた。本発明者は、完全な透過性を有し、外側被覆とポリリジンとの二次反応を必要としない完全に機能性で非組織形成誘導性の被覆体を開発した。

よってこの発明の1つの短点は、実質的に非組織形成誘導性である新規なアルギン酸組成物である。この組成物は、その二価金属イオンアルギン酸ゲル生成物で被覆した移植体の宿主による受容性を損い得る物質を実質的に含有しないものとして提供される。

本発明では、初発の組織形成誘導性アルギン酸調製物を精製して、非組織形成誘導性被覆体により細胞を被覆するのに適切な非組織形成誘導性アルギン酸を生成する。適切な初発のアルギン酸調製物は、好ましくは茶色藻類からアルギン酸を単離することにより得られ、市販されているものである。この発明では、初発のアルギン酸調製物を二価金属イオンキレート剤と接触させて二価金属イオンを除去し、その後大きな表面積の漂白した活性炭と接触させる。炭素は、随伴する蛋白質およびフコース部分と共にポリフェノールを吸着する。蛋白質、ポリフェノールおよびフコース部分を含有する組成物を、この分野では総じて「フカン (fucans)」と呼ぶ。炭素による処理の後に、アルギン酸を溶液から沈殿させて洗浄し、その後ろ過して付加的な不純物を除去し、本発明の非組織形成誘導性アルギン酸を提供する。

ここで使用するように「非組織形成誘導性 (non-fibrogenic)」とは、500 μm 以下の直径を有する移植体を製造するために使用する際に、宿主BALB/cマウスまたは種属イヌへのアルギン酸被覆移植体の腹腔内注射後、少なくとも60日、好ましくは少なくとも6か月、更に好ましくは少なくとも12か月、最も好ましくは少なくとも18か月の間、組織形成およびマクロファージ過剰生育の過程を介する宿主の免疫系による生物学的隔離およびこの結果としての移植体の組織死を誘導しない組成物を意味する。生物学的隔離および組織死は、例

更にこの発明の一部は、生理的に許容し得て非組織形成誘導性であると共に宿主に対して非毒性である完全なバリアー被覆体を用いて移植体組織および他の生物学的な物質を有効に被覆するための製造方法であり、これは中間的な大きさの蛋白質に対して制御された厚さおよび透過性を有する完全なバリアー被覆体を与えるものである。

この被覆体は、組織形成誘導度のフコース (fucose)、ポリフェノールおよび蛋白質を実質的に含有しない。被覆体中のフコース基の量は、一般にアルギン酸ナトリウムのミリグラム当たり約0.2マイクログラム未満であり (なお約0.02重量%未満)、ポリフェノール基の量は、一般にアルギン酸ナトリウムのミリグラム当たり約2.0マイクログラムのタンニン等量未満 (なお約0.2重量%未満) である。

好適な態様の詳細な説明

この発明は、組織移植のための従来技術の被覆体を改良すると共に、組織に対して被覆して組織移植を提供する際に、組織形成誘導および/または宿主の拒絶のような宿主への移植の際の有害な反応を実質的に惹起しない組成物を提供しようという発明者の望むところに起因するものである。

本発明者は、従来技術の移植体の欠点は、移植体を囲繞する宿主組織に対して組織形成誘導性である、市販のアルギン酸調製物に存在するある種の天然の物質のような幾つかの因子の結果であることを突き止めた。調べてこの組織形成誘導性は、移植体の壊死および機能不全を生起する瘢痕組織の不透透性で衰弱に管化された膜における移植体の封入を導くものである。本発明者は、従来技術は、組織形成を発生する際の手段となるフコース、ポリフェノールおよび蛋白質を含有する十分な量の物質をアルギン酸から除去するのに失敗していたことも突き止めた。本発明以前には、移植した膵臓細胞はインシュリンを生成すると言われていたが、移植された被覆細胞を検査すると、常に有意な組織形成の存在が明らかになっていた。これに対して、この発明の精製したアルギン酸を用いて被覆した細胞の移植体は、実質的に組織形成を生成しない。

本発明者は、約200 μm 未満の厚さを有するアルギン酸被覆体を有する移植

例えば膵臓島体組織移植体からのインシュリン生産をモニターすることにより、または糖尿病の宿主における正常血糖 (euglycemic) の維持をモニターすることにより決定することができる。この発明の非組織形成誘導性アルギン酸は、公知の被覆技術を使用する組織または単細胞を被覆するのに適切である。

この発明の被覆した移植体組織および細胞は、組織被覆を損うことなくそれを介して被覆した細胞の懸濁物の通過を許容するのに十分な針直径を有する皮下注射針を介する単純な注射による宿主動物中への移植に有効である。移植のためには、実質的に許容し得るキャリアーと共に、被覆した移植体組織を要素の組成物として処方する。この種の組成物は、移植の際に十分な数の移植体カプセルを与えるために、動物に有効に注入することのできる最大数の被覆した移植体カプセルを含有するものとすべきである。

ここで使用するように「移植」という用語は、宿主動物の体内に移植することを意味する全ての生きた組織、細胞および生物学的に活性な物質、並びにこれらの組織および細胞を移植する行為を包含するよう定義する。これらの組織および細胞は、限定することなく、供与体動物から除去された組織および細胞、供与体組織および細胞のインキュベートまたは培養により得られた組織および細胞、生きた細胞系統から得られた細胞、細胞および組織の生物学的に活性な産物等を含む。移植を所望するいずれかの形態の組織または細胞を、この発明に従って被覆して移植することができる。移植のために最も重要な組織は内分泌器官組織であり、この場合、供与体器官から宿主動物への移植は、宿主の系において供与体器官の作用を少なくとも部分的に複製するのが望ましい。好適な供与体組織は、膵臓島体、肝臓細胞、神経細胞、腎臓皮質細胞、管上皮細胞、甲状腺細胞、副腎細胞、胸腺細胞および卵巣細胞である。しかしながら、他の種類の細胞も利用することができる。

例として、説明を明確にする目的で、限定するようにはなく、膵臓島体および島体細胞の調製および移植について、この発明の方法を以下に記載する。この方法は、当業者に容易に明らかとなるように、異なる組織のいずれかの特に異なる要件を包含するのに必要な従来の自明の改変を用いて、他の器官組織に対しても同様に十分に適用することができる。移植に適切な全ての組織および細胞に対

するこの方法の適用は、この発明の範囲内であることを意図する。

単離された群塊（または移植に適切な他の細胞または組織）は、これらを異質の組織および供体物質から分離するための従来の手順によって調製することができる。

この発明の非繊維形成誘導性アルギン酸を調製するためには、好ましくは特にエチレンジアミン四酢酸（EDTA）のような二価金属イオンキレート化合物を含有する水または緩衝液に初発のアルギン酸凝集物を溶解し、その後大表面積の活性炭炭素と接触させ、存在する全ゆるフカンおよび他の汚染物質を吸着により除去する。約50グラムのアルギン酸を、通常は約1〜10、更に好ましくは約3〜8リットルの水に溶解する。適切な活性炭炭素には、約100メッシュまたはそれより細かい粒度を有する、いずれかの大表面積活性炭炭素が含まれる。好ましくは、少なくとも約1,000、好ましくは少なくとも1,500 m^2/g の表面積を有する非常に微細な活性炭炭素粉末を使用することができる。適切な活性炭炭素が市販されている。

活性炭炭素は、好ましくは使用する前に漂白し、有機汚染物質を酸化して除去する。活性炭炭素は、次亜塩素酸ナトリウム等のような公知の漂白剤を使用して漂白することができる。この炭素は、全ゆる汚染物質を炭素の表面から除去するのに十分な時間の間、漂白剤の希釈溶液を用いてこれを操作することにより漂白することができる。一般に、約0.005〜0.50M、更に好ましくは約0.08〜0.10Mの次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて約5〜30分間、好ましくは約10〜20分間活性炭炭素を操作するが、これは活性炭炭素を酸化するのに十分なものである。酸化の後に、遠心分離またはろ過によって希釈した漂白液から活性炭炭素を除去することができる。水またはエタノールで洗浄し、乾燥する。活性炭炭素に対する初発のアルギン酸の比率（w/w）は、通常は約1:1〜1:20、更に好ましくは約1:2〜1:8とする。明らかに、この発明により許容される最小量を達成するために十分な汚染物質の除去を確実にするのに必要であるよう、活性炭炭素の量を調整することができる。

アルギン酸溶液と漂白した炭素とは単純な混合、攪混または転動によって接触させることができ、その後従来の遠心分離およびろ過によって漂白した炭素を

除去することができる。好ましくは、順次に微細なサブミクロンのフィルターを使用してろ過を行う。

その後希釈した一価陽イオン塩溶液を、アルギン酸の金属イオン結合部位を交換するのに十分な量で、ろ過したアルギン酸溶液に添加する。全ゆる可溶性の一価陽イオン塩を使用することができる。ただし約0.01〜1.0Mの塩化ナトリウムまたはカリウム溶液が好適である。

その後に操作しながらエタノールを添加することにより、結果的に得られた溶液からアルギン酸を沈殿させることができる。一般に、アルギン酸溶液に対するエタノールの比率（v/v）は、約0.25〜2.0、好ましくは約0.5〜1.5とする。その後沈殿させたアルギン酸をろ過により回収し、エタノールで洗浄し、乾燥して痕跡量のエタノールを除去することができる。

前記したようにして得られたアルギン酸は、ホモポリ（アミノ酸）、例えばポリリジンまたはポリアスパラギン酸のような付加的な被覆化合物を使用することなく、移植体組織または細胞を被覆するのにそのまま適切である。しかしながら、アルギン酸の性質を化学的に改変して特定の用途にアルギン酸被覆を適合させるのが場合によっては望ましい。アルギン酸被覆材料の重要な性質には、例えば十分に特定され調節された細孔寸法、被覆厚さ、被覆溶液の粘度、機械的強度等が含まれる。

平均分子量および全体的なグルコネートに対するマヌレート分子比は、最初は実質的に材料の由来によって決定されるが、物理的および化学的な方法によって更に調整することもできる。分子量は、例えば部分的酸加水分解、熱分解または超音波処理によって低減することができる。随伴するアルギン酸組成の変更を用いる調節された沈殿方法により、または選択、分子過またはゲル排除クロマトグラフィにより高分子量を得ることができる。グルコネートに対するマヌレートの比率および配列分布は、一価および二価金属陽イオン、有機溶剤または酸による選択的沈殿または可溶化によって増加または減少させることができる。これらの特性の調整によって、異なる組織移植体を用いて最適の結果が与えられる。

溶液中のアルギン酸の濃度は、アルギン酸の物理的性質の関数である。非常に

低い濃度では、被覆形態が貧弱となる結果、有効でない被覆体が与えられる。非常に高い濃度では、粘度が高すぎて良好な被覆体を形成できない。好ましくは、アルギン酸の分子量（キロダルトン）は、約2〜300、更に好ましくは約4〜250、更に好ましくは約6〜120の範囲とする。初発の分子量が高い場合は、アルギン酸の塩和な酸加水分解によってこれを低減することができる。初発または精製したアルギン酸を希釈酸溶液に溶解し、所望の分子量が得られるまで穏やかに加熱することができる。約0.1〜0.5Mの濃度を有するHCl等のような塩酸の希釈溶液を使用することができる。加水分解の程度は、アルギン酸の分子量をモニターし、所望の分子量が得られたときに加水分解反応を中和することにより調節することができる。明らかに、より高い酸濃度により、結果的により速い加水分解が与えられる。代替的に、適切な加水分解条件を決定するために幾つかの初期試験反応を行えば通常は十分である。

被覆体の多孔度および機械的強度も、アルギン酸重合体中のマヌレート（M）およびグルコネート（G）の相対的な量の関数である。好ましくは、アルギン酸中のM/(M+G)として計算したMの量は、約0.1〜0.95、更に好ましくは約0.15〜0.85、更に好ましくは約0.25〜0.75の範囲である。アルギン酸中のMおよびGの相対的な量は、希釈した（例えば約0.05〜0.50M）塩化カリウム溶液に沈殿させたアルギン酸を溶解し、Mに富む画分を沈殿物中に残したままGに富む画分を再溶解させることにより調整することができる。不溶性の物質は遠心分離によって捕集することができる。その後再溶解したGに富む材料をエタノールの添加によって再沈殿させる。この過程を繰返すことにより、アルギン酸中の全ゆる所望の相対割合のMおよびGを得ることができる。

ホモ重合体アルギン酸配列（ポリマヌレートおよびポリグルコネート）は一般に酸不溶性であるが、交替するマヌレート-グルコネート配列は大半の部分が酸可溶性である。約1.5〜2.5のpH、好ましくは約2.0のpHの酸溶液を用いてアルギン酸を抽出することにより、ホモ重合体に富むアルギン酸を選択的に可溶化することができる。更に、Mに富むアルギン酸は、Gに富むアルギン酸に対して優先的に可溶化される。したがって、酸性溶液を用いるアルギン酸

の処理により、Gに富むアルギン酸が優先的に沈殿し、Mに富むアルギン酸は溶液中に残る。よって、溶液からの沈殿物の分離により、アルギン酸のGに富む画分およびMに富む画分が与えられる。溶液中に存在するGに富むアルギン酸は、カルシウムイオンまたはエタノールの添加によって沈殿させることができる。代替的に、Gに富むアルギン酸は、Mに富む画分を溶液中に残しつつカルシウムイオンを用いてGに富む画分を沈殿させることにより得ることができる。溶液から沈殿物を分離した後に、酸またはエタノールの添加によってMに富むアルギン酸画分を溶液から沈殿させることができる。酸および/またはカルシウムで沈殿させた物質の割合は、それぞれpHおよびカルシウム濃度を調整することにより調節することができる。

前記したようにして得た異なるMに富む画分およびGに富む画分を混合することにより、アルギン酸被覆体中の特定のMおよびGの相対量を得ることもできる。Mに富む材料に対して小部分のGに富む材料を順次に添加することにより、全体的なアルギン酸組成物中のGの量を徐々に増加させ、これにより全体的な被覆体中の二価金属イオン結合部位の数を増加させ、被覆体の構造の剛性を増加させると共に、より大きい細孔寸法を与えることができる。Mに富む画分およびGに富む画分の全ゆる特定の混合物について、アルギン酸中のMまたはGの相対的な量は、NMR分光技術によって容易に決定することができる。¹³C-NMR分光技術はM/G比率および二糖型配列順度を決定するための迅速で安価な方法であるが、¹H-NMRを使用してM/G比率を決定することもできる。アルギン酸被覆体の平均分子量および多孔度は、Mに富む画分およびGに富む画分を異なる割合で混合することにより調整することができる。

本発明のアルギン酸は非繊維形成誘導性であり、ミリグラムのアルギン酸ナトリウム当たり約0.2マイクログラム以下（なお約0.02重量%以下）、好ましくはミリグラムのアルギン酸ナトリウム当たり約0.1マイクログラム未満（なお約0.01重量%未満）、更に好ましくはミリグラムのアルギン酸ナトリウム当たり約0.05マイクログラム未満（なお約0.005重量%未満）の加水分解性フコース結合量を有する。アルギン酸中のフコース糖レベルは、以下の実施例4に記載するような従来の中性糖の分析によって決定することができる。

本発明のアルギン酸は、非繊維形成誘導性の量のポリフェノール、例えばタンニンまたはフロログリゾールを含有する。本発明のアルギン酸中のポリフェノールのレベルを決定するために、本発明者は、水中のタンニンレベルの測定のための標準的な方法に基いて新規な検定を開発した。(M. B. Kloster, Journal of the American Water Works Association 66: 44 (1974)から適用されたHachの水分析ハンドブック (Hach's Water Analysis Handbook)、第2版 (1992)、方法8193参照)。タンニンはポリフェノールであり、ポリフェノールのためのこの発明の新規なアルギン酸検定は、標準的な既知濃度のタンニン酸溶液に基いたタンニン酸または「タンニン等量」に関するポリフェノール含有量を与えるものである。

アルギン酸中のポリフェノールのための本検定では、水中で約1重量%の濃度でアルギン酸サンプルを調製する。アルギン酸サンプルの固分を試験官に入れ、等しい容量の水を対照の試験官に入れる。同様な量の炭酸ナトリウム溶液およびタンニバー (TANNIVER) (商標名) 3試薬 (タングステン酸ナトリウム、リン酸、塩酸、無水モリブデン酸ナトリウム、硫酸リチウムおよび水ガラス1%の他の試薬) をサンプルおよび対照の両者に添加し、その後溶液を混合し、室温で約30分間インキュベートする。その後約700nmでサンプルおよび対照の吸光度を測定する。

タンニン酸の適切な標準曲線は、約0.1~10 $\mu\text{g}/\text{m}$ の範囲に渡って変動するタンニン酸標準濃度を使用して作成することができる。対照の吸光度を差引くことにより余剰のサンプルの吸光度を校正した後、標準タンニン酸溶液から作成した標準曲線に対してアルギン酸サンプルの吸光度をプロットし、アルギン酸サンプルのミリグラム当りに存在するタンニン酸のマイクログラム数、またはミリグラムのアルギン酸当りの「タンニン等量」のマイクログラムを決定することができる。前記したポリフェノール/タンニン酸検定を用いて試験した場合、本発明のアルギン酸は、ミリグラムのアルギン酸ナトリウム当り約2.0マイクログラム以下のタンニン等量 (なお約0.2重量%以下) を含有することが示される。好ましくは、アルギン酸は、ミリグラムのアルギン酸ナトリウム当り、約1.0マイクログラム以下のタンニン等量 (なお約0.1重量%以下)、更に好ま

しくは約0.75マイクログラム以下のタンニン等量 (なお約0.075重量%以下) を含有する。

本発明の方法により、宿主の免疫系の免疫学的に有効な濃度の構成成分が組織と相関するのを排除する障壁バリアーとして適切であって、栄養素および他の物質の十分な拡散を可能としてこれらがその長い寿命および生存性のために必要な移植体と接触するに至るのに必要な透過性を有するアルギン酸ゲル被覆体の調製が可能となる。

約0.7~2.5重量%のアルギン酸の濃度を有するアルギン酸の被覆溶液の粘度は、25℃で約10~250センチポアズ、好ましくは約20~100センチポアズの粘度を有するべきである。

この発明の方法の第1の工程では、単離した移植体 (または他の細胞または組織) を等量の塩酸溶液で洗浄し、精製したアルギン酸の溶液に懸濁する。必要に応じて、ただし必ずしも必要なものではないが、洗浄した細胞をポリ-L-リジンの水溶液で予備処理して細胞とアルギン酸との結合を増加させることができ、その後塩酸溶液で洗う。

アルギン酸中の細胞懸濁物を液滴に形成し、液滴と二価金属、好ましくはアルカリ土類金属の塩溶液と接触させてアルギン酸をゲル化させる。液滴はいずれかの従来の手順によって形成することができる。例えば、細胞材料を含有するアルギン酸ナトリウムの溶液を乳化してアルギン酸ナトリウムおよび細胞の液滴を形成し、塩化カルシウムを用いて液滴をゲル化させることによりアルギン酸小滴を形成することができる (米国特許第4,352,683号)。液滴を針から強制的に出すシリジおよびポンプを用い、層流エアナイフを使用して先端から液滴を分離し、塩化カルシウム溶液中で捕獲することにより液滴をゲル化させてアルギン酸小滴を形成することもできる (米国特許第4,407,957号)。皮下注射針から押出し、その後液滴が塩化カルシウム溶液中に落下するようにすることによりアルギン酸小滴を形成することもできる (Nigam et al. Biotechnology Techniques 2: 271-276 (1988))。更に、塩化カルシウムを含有する向流の流れに液滴を注入することもできる (米国特許第3,962,383号)。噴霧ノズルを介してアルギン酸溶液を噴霧して液滴のミストを形成し、これを塩化カルシウム溶液中で捕獲する

ことも利用することができる (Plunkett et al. Laboratory Investigation, 62: 510-517 (1990))。

針とパルスかけた電氣的静電圧との組合せを使用して均一な液滴を形成することによってもアルギン酸液滴を形成することができる (Hommelらに対する米国特許第4,789,550号)。アルギン酸溶液を強制的に針の先端を通過させて液滴を形成し、針の先端と針の先端の下方に配置した塩化カルシウム溶液との間で静電場を変化させることにより、針から液滴を引張るようにすることができる。液滴は針から1つの極性の荷電を受取るが、これは塩化カルシウム溶液中の荷電とは反対のものである。液滴と反対に荷電した塩化カルシウム溶液との間の電圧差が、液滴の溶液による誘引が針の先端上に液滴を保持する界面張力の力を超える閾値に達した場合、液滴は引張られて遊離し、塩化カルシウム溶液中に落下する。平方波形態を使用して静電場を波動させ、閾値と文意する一連の電圧を発生させ、これにより平方波サイクル当り1つの一連の液滴を生成する。この方法は、有効な移植に必要な小さい液滴および薄い被覆体を与えないと考えられる。

ここで使用するために好適な液滴形成およびゲル化手順は、1992年5月29日に出版された米国特許第07/890,982号に記載されており、この出願の明細書および図面全体、更に詳しくは液滴形成およびゲル化手順を説明する部分を、この方法の更に完全な説明のために参考としてここに援用する。

移植体細胞のような生きた生理的に活性な組織細胞を含有する組織は、約10~200 μm の厚さを有する被覆体を隔てるものとする。この被覆体は、二価金属アルギン酸ゲル、好ましくはアルギン酸カルシウム、アルギン酸マグネシウムまたはこれらの混合物を含み、金属アルギン酸は、アルギン酸で被覆した組織移植体の生存性および長い寿命を損ない得る不純物を含有しないアルギン酸から形成したものである。被覆体カプセルは、好ましくは移植体の後に組織細胞を宿主の免疫構成成分から保護するのに十分に低い透過性および十分に大きい厚さを有し、被覆体は、細胞の生存に必要な十分な細胞栄養物および細胞産物が被覆体を介して拡散するのを可能とするよう十分に透過性で薄いものである。被覆体は、好ましくは少なくとも約10 μm かつ約50 μm 未満の厚さを有する。最も好ましくは、単一の細胞または1~2の細胞が単一のカプセル内に存在するものとす

る。所望に応じて、複数のアルギン酸被覆体を細胞に施し、多層カプセルを生成することができる。

分子透過性の更なる低減を所望する場合、またはアルギン酸被覆体の膨潤の低減が必要な場合は、必要に応じて、ただし必ずしも必要なものではないが、被覆した組織をポリ陽イオン重合体の溶液に浸漬することによって、ポリ-L-リジンまたは他の生理的に受容し得て非毒性のポリ陽イオン重合体を用いてアルギン酸ゲル被覆体を架橋することができる。透過性の低減は、ポリ陽イオンの重合の程度、ポリ陽イオンとアルギン酸被覆体との反応、溶液中のポリ陽イオンの濃度、およびインキュベーション時間の関数である。最適なポリ陽イオンおよび反応条件の選択は従来のものであり、完全に従来技術の範囲内である。溶液から重合体を枯渇させることによって、または洗浄の希釈によって反応を停止させることができる。

ポリリジンおよびポリ陽イオンは、一般に組織形成を誘導するものであり、被覆した生成物の生体適合性を改良するためには、アルギン酸-ポリ陽イオン重合体の更なる処理が望ましい。ポリ陽イオン反応生成物をアルギン酸ナトリウムの溶液に浸漬して被覆体表面の遊離のε-アミノ基を反応させるとイオン交換反応が導かれ、その際に金属アルギン酸コアが、これからの二価金属陽イオンの枯渇によって部分的にまたは完全に可溶化される。しかしながら、痕跡量の可溶性のアルギン酸がこのような処理の後に残存すると、固化した材料のカプセルからの遅い拡散により、特にアルギン酸はその可溶性の形態で組織形成を誘導すると知られていることから、組織形成反応に至り得る。アルギン酸の完全な可溶化およびそのコアからの除去の前にアルギン酸処理した生成物を二価金属イオンで処理すると、金属イオンはアルギン酸ナトリウムと反応し得て被覆層を横切って外側に移動し、これにより膜の剛性が損なわれ、被覆体表面に対する組織芽細胞付着の可能性が増大する。

したがって、アルギン酸を外側被覆で使用する場合は、例えばクエン酸ナトリウムまたはEDTAを用いて、カルシウムイオンのイオン交換またはキレート化によってコアゲルを完全に溶解させるよう反応を実施すべきである。その後洗浄媒体を数回取り替えるかまたはろ過・浸透によって生成物を遊離的に洗浄するこ

とができ、可溶性のアルギン酸が十分な時間をかけて被覆体から完全に脱離するのを可能とする。アルギン酸が被覆体を介して外側に脱離すると共に、ポリ陽イオンの遊離の残余のアミノ基がこれと反応することができる。

好ましくは、ポリアスバラギン酸と反応させることにより、ポリ陽イオン置換アルギン酸被覆相移植物体に陰性の荷電を施す。その低い結合親和力のために、ポリアスバラギン酸が金属イオンを置換して一次アルギン酸ゲル被覆体から枯渇させる可能性は小さい。これは一次アルギン酸被覆体を溶解させることなくポリ陽イオンと反応する。最終反応体としてポリアスバラギン酸を使用すると、アルギン酸最終複合体を使用する場合に対して幾つかの利点が与えられる。これにより、付加的な架橋および圧縮した被覆体の容量の低減のために、より大きい機械的強度、より小さい被覆生成物の直径および低い透過性が与えられる。

以下の具体的な、ただし限定するものではない実施例によってこの発明を更に説明する。特に明記しない限り、%は重量%で与えるものとし、温度は摂氏とする。これらの実施例では、実験室で実施するよう限定した手順は過去形で表現し、この出願において慣例的に限定した手順は現在形で表現するものとする。

実施例

実施例1—高マツノノエートのアルギン酸の調製

マクロンステイス・ピリフェラ (*Macrosystis pyrifera*) から単離した50 gの低粘度アルギン酸ナトリウム (LVAアルギン酸、ノルック社のケルコ部 (KELCO Div. of Merck & Co.)) を5リットルの水に溶解し、50ミクロンのメッシュを介してろ過して粒子を除去した。18.6 gのEDTA二ナトリウムを溶液に添加して溶解させた。溶液をローラーミル上で200 gの次要塩素酸で漂白した活性炭炭素 (マリンクロット (Mallinckrodt) 活性炭炭素粉末) と30分間混合し、ポリフェノールおよびフコース糖残渣のような有機汚染物質を除去した。その後30分間の遠心分離によって活性炭炭素を除去した。この結果得られた溶液を順次にろ紙 (0.45ミクロンのフィルター、0.22ミクロンのフィルターおよび0.1ミクロンのフィルター) を介してろ過した。その後ろ過した溶液に30 gの塩化ナトリウムを添加し、ローラーミル上で撹動させることにより溶解

させた。5 lの正味のエタノールを添加することにより、アルギン酸を溶液から沈殿させた。サンプルを30分間遠心分離してアルギン酸ペレットを取得し、アルギン酸ペレットをエタノールに懸濁した後にピンセットを用いて細く切り、サンプルの完全な洗浄を確実なものとした。過剰のエタノールを揮って除去し、沈殿物を押圧した。結果的に得られた沈殿物を真空中に60℃でオーブン内で乾燥させた。

実施例2—高グルコネートのアルギン酸の調製

80 gのプロタンアルギン酸 (protan alginate) をローラーミル上で撹動させることにより89 lの水に溶解させた。溶液を50ミクロンのメッシュを介してろ過して粒子を除去し、その後ローラーミル上で30分間連続的に混合しつつ320 gの漂白した活性炭炭素と混合した。その後30分間遠心分離することにより活性炭炭素を除去した。この結果得られた溶液を順次にろ紙 (0.45ミクロンのフィルター、0.22ミクロンのフィルターおよび0.1ミクロンのフィルター) を介してろ過した。その後163 gの塩化マグネシウムを溶液に添加し、ローラーミル上で撹動させることにより溶解させた。その後210 mlの1.7%塩化カルシウム溶液を添加し、ローラーミル上で30分間撹動させることにより混合した。この結果得られた溶液を30分間遠心分離してアルギン酸ペレットを生成した。ローラーミル上で撹動させることにより、アルギン酸ペレットを3.0リットルの0.1M EDTA (pH 7.0) に溶解させた。必要に応じて溶液のpHをpH 7.0に調整した。その後この溶液に20 gの塩化ナトリウムを添加して溶解させた。

5 lの正味のエタノールを添加することにより溶液からアルギン酸を沈殿させ、その後30分間遠心分離してアルギン酸ペレットを得た。その後アルギン酸ペレットをエタノールに懸濁し、ピンセットを用いて細く切り、サンプルの完全な洗浄を確実なものとした。過剰のエタノールを揮って除去し、沈殿物を押圧した。その後アルギン酸沈殿物を真空中に60℃でオーブン内で乾燥させた。

実施例3—フコースおよびタンニン等量含有量の決定

新たに調製したタンニン酸溶液 (0.1 mg/ml) を希釈し、10.0、5

0.3、0.1、0.0、0.4および0.1 μg/mlの濃度を有する標準溶液を取得することにより、標準タンニン酸溶液を調製した。その後分光光度計内で700 nmで読取ったそれぞれのサンプルの吸光度に対してタンニン酸の濃度をプロットすることにより、タンニン酸の標準曲線を作成した。

実施例1および2のアルギン酸のサンプル溶液を1原量%で調製した。それぞれのサンプルの2 mlの部分を5 mlの試験管に入れた。2 mlの水を対照として試験管に入れた。その後炭酸ナトリウム溶液 (ハッチ・カト (Hach Cat.) 675-49の0.4 ml) を、対照を含むそれぞれの試験管に入れた。タンニバー (TANNIVER) (商標名) 3試薬 (0.04 ml) をそれぞれの試験管に添加し、完全に混合した。その後試験管を室温で30分間インキュベートした。サンプルを石英のキュベットに移し、分光光度計内で700 nmで吸光度を読取った。サンプルブランクのキュベットの吸光度について校正した後、それぞれのアルギン酸溶液の吸光度をタンニン酸の標準曲線に対してプロットし、アルギン酸ナトリウムサンプルのミリグラム当りのタンニン酸等量のマイクログラム数を決定した。実施例1のアルギン酸は、アルギン酸ナトリウムのミリグラム当り1.0マイクログラムのタンニン酸等量含有することが分かった (0.1原量%)。実施例2のアルギン酸は、アルギン酸ナトリウムのミリグラム当り0.7マイクログラムのタンニン酸等量含有することが分かった (0.07原量%)。

比較のために、実施例1および実施例2のアルギン酸を調製するのに使用した初発のアルギン酸を、前記したポリフェノール/タンニン酸検定を使用してポリフェノール含有量について検定した。実施例1および2の精製したアルギン酸を調製するのに使用した初発のアルギン酸のそれぞれは、ミリグラムのアルギン酸当り約2.0マイクログラムのタンニン酸等量含有することが分かった。初発のアルギン酸組成物と比較して、実施例1の精製方法により、約90%を超えるタンニン酸等量の低減が与えられ、実施例2の方法により、約90%を超えるタンニン酸等量の低減が与えられた。本発明の方法は、初発のアルギン酸中のポリフェノールのレベルを實質的に低減させるのに有効である。

実施例4—フコース精分析

アルギン酸サンプル中のフコースの含有量は、ガスクロマトグラフィ質量分析

計 (GC-MS) 分析によって決定することができる。GC-MS分析のためのサンプルを調製するために、1~3 mgのそれぞれのサンプルを秤量し、スクリーン添加 (100 mm x 13 mm) の試験管に入れた。内部標準として50 μgのイノシトールを含有するH₂SO₄ (1Nで0.5 ml) をその後それぞれの試験管に添加した。その後10.0、0.1、0.0、0.1および0.01 μgのフコースを含有する標準試験管を同様の様式で調製した。

全ての試験管を121℃で1時間 (または3時間) 加熱した。加熱の後、試験管を冷却し、化学量論量の塩化バリウムを添加した。中和した試験管を遠心分離し (10分、1500 × g)、生成した硫酸バリウムを除去した。サンプル中に残留する水は空気流下で蒸発させた。

その後サンプルをホウ化水素ナトリウムを用いて還元した (1NNH₄OH 中1 mg/ml NaBH₄、0.5 ml溶液、室温で1時間)。還元の後、200マイクロリットルの氷酢酸を添加することにより過剰のホウ化水素物を分解し、空気流下で蒸発させた。

200マイクロリットルの無水酢酸および20マイクロリットルの1-メチルイミダゾールを使用し、還元したサンプルをアセチル化した (室温で10分)。その後サンプルを2 mlの水と2 mlの塩化メチレンとの間で分配した。水相を除去し、残る有機相を蒸発させた。その後それぞれのサンプルに50マイクロリットルのアセトンを添加し、5970 HP質量選択検出器に接続した5890 HPガスクロマトグラフにサンプルの部分を注入した。GCによる分離は、3°/分で160~210℃となる温度勾配を使用し、J&W DB-23カラム (30メートル、0.25 mm I.D.) により行った。MS分析は、反応時間の比較および真正の標準物とスペクトルを比較することにより行った。

初発のアルギン酸および実施例1および2の精製したアルギン酸についてのフコース分析の結果を以下の表に示す。

表：フコース分析結果

サンプル	フコース (μgフコース/mgサンプル)
実施例1 (初発)	2.91 (0.291重量%)
実施例1 (精製)	<.01 (<0.001重量%)
実施例2 (初発)	0.70 (0.07重量%)
実施例2 (精製)	0.09 (0.009重量%)

実施例1 (精製) のフコースレベルは、実施例1 (初発) のフコースレベルと比較して300を超える倍率で低減する。アルギン酸の実施例2 (精製) のフコースレベルは、実施例2 (初発) と比較して8の倍率で低減する。

実施例5 - 腫瘍細胞懸濁物の調製

ラットから単離した腫瘍細胞を等量塩酸溶液で洗浄し、実施例1および実施例2の手順により調製したアルギン酸を溶解することにより調製したアルギン酸溶液に、等濃度圧 (約0.81重量%) のために必要な十分な塩化ナトリウムを含む10mM HEPES、0.01M クエン酸ナトリウム中の1.9重量%の精製したアルギン酸中にてm1当り10,000細胞の濃度で懸濁し、最終溶液が32℃で約50センチポアズの粘度を有するものとした。細胞は150μmのおよその平均直径を有していた。イマの細胞を用いてこの手順を繰返した。

実施例6 - 腫瘍細胞の接種

針の先端で接種した0.117Mの塩化カルシウム水溶液との間で周囲温度でファン・デ・グラフ (van de Graff) 発電機により生成した8KVのDC静電圧を使用し、実施例5の手順により調製した腫瘍細胞の懸濁物 (μL当り25の細胞) を、約200μm/分の流速で20ゲージの針を通過させた。細い減衰した流れとして針から出た懸濁物は液滴へと転換し、この液滴を塩化カルシウム溶液中で捕集した。溶液中のカルシウムイオンとの反応により液滴をゲル化させた。細胞上のアルギン酸カルシウム被覆は平滑かつ均一であり、約130μmのおよその厚さを有していた。全体の被覆した粒子は、約360μmの平均直径を有していた。

実施例5の手順によって調製したイマの細胞を用いてこの方法を繰返した。

実施例7 - 結核菌マウスへの腫瘍細胞移植 (IP)

移植の数日前に、0.1M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) 中の50mg/mLのストレプトゾシン (streptozocin) (250mg/kg) をIP注射することにより、宿主B a 1 b/Cマウスを糖尿病状態とした。

実施例6の手順により調製した被覆したイマのランゲルハンス島を、1つの群のマウスにマウス当り2000〜3000細胞でIP注射した。マウスは正常血糖となり、72週間 (18か月) に渡ってこれを維持した。移植の数週間後に、数匹のマウスは糖尿病状態に戻った。これらのマウスを屠殺し、被覆した細胞を検査した。アルギン酸で被覆した細胞は生きており、組織形成はなく、マクロファージの過剰生育はないことが分った (被覆した細胞カプセル当り2〜10のマクロファージのみ)。

同じアルギン酸から形成した球体 (細胞を含まない) を、対照群のB a 1 b/CマウスにIP注射した。数日乃至数週間の期間で間隔を置いてマウスを屠殺した。アルギン酸球体を組織学的に検査したところ、組織形成はなく、マクロファージの過剰生育は実質的にないことが分った。

明らかに、前記した数示に照らして、本発明の多数の改良および変更が可能である。したがって、添付する請求の範囲の範囲内で、ここに具体的に記載した以外に、この発明を実施し得ることを理解すべきである。

国際調査報告		International Application No. PCT/US93/05461
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(3) : A61F 5/02; A61M 1/02; C12N 11/04 US CL : 424/422, 423, 424, 435/1, 182, 240, 241, 328/18 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/422, 423, 424, 435/1, 182, 240, 241, 328/18 Documentation searched other than minimum documentation in the event that such documents are included in the fields searched Electronic data have been consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claims No.
Y	US, A, 4,663,286 (TSANG ET AL.) 05 MAY 1987, SEE COLUMN 3, LINES 4-38; COLUMN 5, LINES 51-57; COLUMN 7, LINES 20-23.	1-35
Y	US, A, 4,689,293 (GOOSEN ET AL.) 25 AUGUST 1987, COLUMN 3, LINES 33-42, 66-68; COLUMN 4, LINES 1-11.	1-35
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Some categories of prior art documents "A" documents affecting the priority date of the invention are not considered as prior art of the invention "B" prior documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "C" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "D" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "E" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "F" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "G" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "H" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "I" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "J" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "K" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "L" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "M" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "N" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "O" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "P" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "Q" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "R" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "S" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "T" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "U" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "V" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "W" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "X" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "Y" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention "Z" documents published after the international filing date but not yet published in the language of the application are not considered as prior art of the invention		
Date of the latest designation of the international search		Date of mailing of the international search report
12 JULY 1993		AUG 19 1993
Printed and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademark Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. NOT APPLICABLE Form PCT/US 4218 (Issued March 1993)		Authorized officer CARLOS ALPHERO Telephone No. (703) 205-2331

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, J P, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, VN

(72)発明者 コチラム、ケント シー。
アメリカ合衆国 95616 カリフォルニア
州 デイヴィス イエローストーン アベ
ニュ 35715

(72)発明者 ブリーランド、ヴァレリー
アメリカ合衆国 94705 カリフォルニア
州 パークレー エディス ストリート
1427